

JP9238685

Publication Title:

CEREBRAL ISCHEMIA-RELATED GENE

Abstract:

Abstract of JP9238685

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject new gene coding for a polypeptide having a specific amino acid sequence, to be induced in astrocytes when exposed to a hypoxic condition such as cerebral ischemia-reperfusion followed by being exposed to oxygen again, thus useful for preventing/treating cerebral ischemic diseases. **SOLUTION:** This gene is a new cerebral ischemia-related gene containing a base sequence coding for a polypeptide composed of a amino acid sequence of the formula. This gene is expressed and induced in astrocytes when exposed to a hypoxic condition such as cerebral ischemia-reperfusion followed by being exposed to oxygen again, therefore being useful for preventing/treating cerebral ischemic diseases of producing new polypeptides. This gene is obtained by the following process: a cerebral hemisphere is extracted from a SD-strain rat just after born and then put to enzymegenation to isolate cells which, in turn, are cultured in a medium spiked with cytosine arabinofuranoside and astrocytes are separated followed by isolating mRNA by conventional method, and the mRNA is subjected to PCR using a reverse trnascriptase and a primer to effect cloning.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

Courtesy of <http://v3.espacenet.com>

This Patent PDF Generated by Patent Fetcher(TM), a service of Stroke of Color, Inc.

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - <http://www.sughrue.com>

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-238685

(43) 公開日 平成9年(1997)9月16日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A	9282-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 0 7 K 14/47			C 0 7 K 14/47	
			16/18	
C 1 2 N 1/21			C 1 2 N 1/21	
5/10			C 1 2 P 21/08	

審査請求 未請求 請求項の数10 OL (全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平8-49380

(22) 出願日 平成8年(1996)3月7日

(71) 出願人 000002956
田辺製薬株式会社
大阪府大阪市中央区道修町3丁目2番10号

(71) 出願人 595148246
遠山 正彌
大阪府豊中市新千里北町2丁目9-3

(72) 発明者 遠山 正彌
大阪府豊中市新千里北町2丁目9-3

(72) 発明者 高木 勉
大阪府箕面市桜井3丁目10-31-202

(72) 発明者 今井 祐二
兵庫県芦屋市西山町17-10-113

(74) 代理人 弁理士 箕浦 繁夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 脳虚血関連遺伝子

(57) 【要約】

【課題】 脳虚血-再灌流時、より詳しくは、低酸素条件下に曝された後再び酸素に曝されたときに、アストロサイトにおいて発現誘導される脳虚血関連新規遺伝子、および該遺伝子がコードする新規ポリペプチドを提供する。

【解決手段】 配列番号3又は6で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする塩基配列を含む遺伝子、並びに該遺伝子がコードするポリペプチド、そのフラグメントまたはそれらのホモログ。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号3で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする塩基配列を含む遺伝子。

【請求項2】 配列番号6で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする塩基配列を含む遺伝子。

【請求項3】 配列番号1、配列番号2、配列番号4及び配列番号5からなる群より選ばれる塩基配列を含む遺伝子。

【請求項4】 アストロサイトが低酸素条件に曝された後再酸素化された際に特異的に発現する請求項1、2又は3のいずれかの項に記載の遺伝子。

【請求項5】 配列番号3及び配列番号6からなる群より選ばれるアミノ酸配列を有するポリペプチド、そのフラグメントまたはそれらのホモログ。

【請求項6】 請求項5に記載のポリペプチド、そのフラグメントまたはそれらのホモログをコードするDNA。

【請求項7】 配列番号1、配列番号2、配列番号4及び配列番号5からなる群より選ばれる塩基配列を有するDNAまたはそのフラグメントまたはそれらに選択的にハイブリダイズする核酸。

【請求項8】 請求項1、2または3のいずれかの項に記載の遺伝子もしくはそのフラグメントを含む複製又は発現プラスミド。

【請求項9】 請求項8記載の複製又は発現プラスミドで形質転換された宿主細胞。

【請求項10】 請求項5に記載のポリペプチド、そのフラグメントまたはそれらのホモログに対するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は脳虚血に関与する遺伝子とその遺伝子がコードするポリペプチドに関する。より詳細には、アストロサイトが低酸素条件に曝された後再酸素化された際に特異的に発現する遺伝子とその遺伝子がコードするポリペプチドに関する。

【0002】

【従来の技術】脳梗塞などの脳虚血に起因する疾患は患者に重篤な後遺症を残し、社会的損失と社会的負担を生み出しており、その予防法と治療法の開発が強く求められている。脳虚血に陥った場合、脳内のニューロン（神経細胞）の機能が損なわれるが、それに伴う脳内の生体反応、神経細胞の虚血に対する反応等についてはほとんど解明されておらず、その為にこれら疾患の予防法や治療法の開発も進んでいない現状にある。これら疾患の予防法や治療法を開発するには、脳虚血に伴う脳内の生体反応、神経細胞の虚血に対する反応等について解明するとともに、障害をもたらす反応と治癒に働く反応を区別して、前者を抑制し後者を亢進させる方法を開発する必要がある。一方、アストロサイト（神経膠星状細胞）

は、ニューロン（神経細胞）の機能と生存を修飾し、ニューロンの生存を維持するために重要な働きをすることが知られている。アストロサイトが虚血時にどのような反応を示すか、具体的には、どのような遺伝子が発現誘導され、どのようなポリペプチドが産生されるか、そしてそのポリペプチドがニューロンの生存を維持する方向に働くかどうかを調べることは、脳虚血に起因する疾患の予防あるいは治療法開発に有効な知見と手段を与えるものとして望まれていた。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、脳虚血一再灌流時、より詳しくは、低酸素条件に曝された後再び酸素に曝されたときに、アストロサイトにおいて発現誘導される新規遺伝子およびその遺伝子がコードする新規ポリペプチドを提供することにある。また、本発明の他の目的は、前記ポリペプチドをコードするDNA、前記遺伝子もしくはDNAに選択的にハイブリダイズする核酸、前記ポリペプチドに対する抗体を提供することにある。上記以外の目的については以下の記載より明らかである。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、動物生体内における脳虚血状態を試験管内で再現する系について鋭意研究した結果、脳虚血一再灌流の優れたin vitroモデルとして、神経細胞の一種であるアストロサイトの初代培養細胞を低酸素処理した後再び酸素に曝す系を確立した。本発明者らはこの系を用いることにより、低酸素条件に曝された後再酸素化されたアストロサイトにおいて特異的に発現する脳虚血関連の新規遺伝子を見いだした。この遺伝子は、通常の酸素状態にあるアストロサイト及び低酸素状態にあるアストロサイトではほとんど発現が認められないが、アストロサイトが低酸素条件に曝された後再酸素化された際（即ち、通常の酸素状態に戻された際に）に発現誘導される遺伝子として見いだされた。

【0005】すなわち本発明は、配列番号3又は6で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする塩基配列を含む遺伝子、並びに該遺伝子がコードする脳虚血関連ポリペプチド、そのフラグメントまたはそれらのホモログである。

【0006】後記配列表の配列番号1は、ラット由来の脳虚血関連遺伝子、すなわちラットアストロサイトを低酸素条件に曝した後再酸素化した際に特異的に発現する遺伝子（ラットYT521遺伝子）のほぼ全長のcDNA塩基配列（約3.2kbp）を表す。配列番号2は、配列番号1のcDNA塩基配列中のオープンリーディングフレーム（配列番号1の配列中第317番目から2452番目の塩基に相当する部分）の塩基配列を表す。配列番号3は、配列番号2の塩基配列を翻訳して得られるアミノ酸配列、すなわちラットYT521遺伝子がコー

ドするポリペプチドのアミノ酸配列を表す。このアミノ酸配列から推定される分子量は約83Kdである。

【0007】また、後記配列表の配列番号4は、ヒト由来の脳虚血関連遺伝子、すなわちYT521遺伝子のヒトホモログ（ヒトYT521遺伝子）の部分cDNA塩基配列（約1.4kbp）を表す。配列番号5は、配列番号4のcDNA塩基配列中にある3'側コーディング領域（配列番号4の配列中第1番目から584番目の塩基に相当する部分）の塩基配列を表す。配列番号6は、配列番号5の塩基配列を翻訳して得られるアミノ酸配列、すなわちヒトYT521遺伝子がコードするポリペプチドのC末端側部分アミノ酸配列を表す。

【0008】前記配列番号1、2、3、4、5及び6に示される塩基配列もしくはアミノ酸配列について、既知DNAデータベース（GenBankおよびEMBL）及びプロテインデータベース（NBRF及びSWISS-PROT）に含まれる全ての配列に対してホモロジー検索を行った結果、一致するものはなく、これら配列は、新規なものであると考えられる。また、ヒトYT521遺伝子がコードするポリペプチドの部分アミノ酸配列（配列番号6、193アミノ酸）と、ラットYT521遺伝子がコードするポリペプチドのC末端側部分（配列番号3のC末端側193アミノ酸）のアミノ酸配列を比較すると、2残基の置換が認められるのみであり、両者で高いホモロジーが保存されている。

【0009】

【発明の実施の形態】本発明の脳虚血関連遺伝子あるいはそのcDNAは、例えば脳由来の神経系細胞などを遺伝子源としてスクリーニングを行い、遺伝子を単離取得できる。このような細胞としては、例えば哺乳動物（例えばラット、マウス等）の中枢神経系の細胞（アストロサイト等）が挙げられる。またこの他、神経系細胞への分化誘導が可能な細胞を用いることができ、このような細胞として、例えばマウス胚性腫瘍細胞P19 [Jones-Villeneuveら、journal of Cell Biology、第94巻、第53～262頁]、神経芽細胞腫などが挙げられる。

【0010】cDNAもしくは遺伝子のスクリーニング及び単離は、例えば、ディファレンシャル・ハイブリダイゼーション法 [Cell、第16巻、第443～452頁 (1979年)]、サブトラクション法 [Nucleic Acids Research、第16巻、第10937頁 (1988年)] 及び Proceedings of the National Academy of Sciences、第88巻、第11505～11509頁 (1991年)]、ディファレンシャル・ディスプレイ法 [Science、第257巻、第967～971頁 (1992年)] 及び Cancer Research、第52巻、第6966～6968頁 (1992年)] など、発現量の変化する遺伝子を選択的にスクリーニングできる遺伝子スクリーニング法を用いることにより好適に実施できる。

【0011】脳虚血-再灌流のin vitroモデルは、例えばアストロサイトの初代培養細胞を用い、これを低酸素

条件に曝した（すなわち低酸素処理した）後、通常の酸素条件下に戻すかこれより高い酸素条件下に曝して（再酸素化する）ことにより作成することができる。より具体的には、通常の酸素条件下での培養（通常培養）は、95%空気、5%CO₂という条件の培養機中で培養することにより実施でき、低酸素条件下での培養は、95%N₂、5%CO₂（O₂濃度1%以下）という条件の培養機中で培養することにより実施できる。低酸素処理は、前記のように通常の酸素条件下で培養した細胞を、低酸素条件下の培養機中に移して約24時間程度培養すればよい。再酸素化は、前記のように低酸素処理した細胞を、再び、通常培養の条件下に戻して培養することにより実施できる。

【0012】本発明の遺伝子は、例えば上記のようなアストロサイトの脳虚血-再灌流in vitroモデルを用い、ディファレンシャル・ディスプレイ法等により、遺伝子のスクリーニングを行って取得することができる。具体的には、初代培養アストロサイトを用い、これを低酸素処理後再酸素化した細胞、およびこれに低酸素処理のみ施した細胞の各々からmRNA（もしくはこれを含む全RNA）を抽出し、逆転写酵素（reverse transcriptase）を用いてこれを一本鎖cDNAに変換する。続いて、得られた一本鎖cDNAを鋳型とし、適当なプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応（PCR；Polymerase Chain Reaction）を行う。プライマーとしては、例えば、ランダムプライマー [任意の配列からなる約10～12merのプライマー] を用いて実施できる。あるいは、プライマーとして、アンカープライマー（anchored primer）及びアービトラリープライマー（arbitrary primer）各一種ずつを組み合わせてプライマーとして用いて実施してもよく、このようなアンカープライマーとしては、オリゴd(T)nVX [n=11～12；V=G, A又はC；X=G, A, T又はC] からなるプライマーを用い、アービトラリープライマーとしては、任意の配列からなる約10merのランダムプライマーを用い、このようなPCR反応を、種々のプライマーを組み合わせて行うことで、より広い範囲の遺伝子群をスクリーニングすることが可能となる。続いて、得られたPCR産物をゲル電気泳動し、ゲル上に展開（ディスプレイ）されるmRNAの発現パターン（フィンガープリント）を比較解析することにより、低酸素処理した後再酸素化した細胞で特異的に発現している遺伝子を選択し、常法によりそのcDNA断片を単離することができる。

【0013】さらに得られたcDNAをプローブとし、低酸素処理後再酸素化した細胞及びこのような処理を行わなかった対照細胞のmRNAに対して、ノーザンブロットングを行うことにより、選択した遺伝子のmRNAが、再酸素化した細胞で特異的に発現していることを確認することができる。

【0014】かくして、本発明の脳虚血関連遺伝子のcDNAを単離・取得することができる。上記のようにして得られたcDNAをプローブとして用いて、cDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、全長cDNAを取得できる。cDNAライブラリーは、脳由来のものを用いることが好ましい。また、得られたcDNAの塩基配列を決定することにより、遺伝子産物のポリペプチドをコードする翻訳領域を決定でき、このポリペプチドのアミノ酸配列を得ることができる。

【0015】また、得られたcDNAをプローブとして、ゲノミックDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、染色体遺伝子を単離することができる。また、他の哺乳動物のDNAライブラリーをスクリーニングすることにより異種生物由来の相同遺伝子を単離することができる。このような哺乳動物としては例えばラット、マウス、ウサギ、サル、ヒトなどが挙げられる。

【0016】cDNAライブラリー及びゲノミックDNAライブラリー等のDNAライブラリーは、例えば、「Molecular Cloning」[Sambrook, J., Fritsch, E.F.及びManiatis, T. 著、Cold Spring Harbor Laboratory Pressより1989年に発刊]に記載の方法により調製することができる。あるいは、市販のライブラリーがある場合はこれを用いてもよい。

【0017】本発明の遺伝子もしくはDNAは、その塩基配列（或はその一部）がわかっている場合には、化学合成法によるか、あるいはPCR (Polymerase Chain Reaction) 法によるか、あるいは、該塩基配列の断片や化学合成した部分配列のDNA等をプローブとして、適当なDNAライブラリー（cDNAもしくはゲノミックDNAライブラリー等）をスクリーニングすることにより取得することもできる。

【0018】本発明の遺伝子（cDNAあるいは染色体遺伝子など）が、脳虚血に関連する遺伝子であることは、例えば次のようにして検証することができる。すなわち、検証する遺伝子もしくはその断片を適当なRNAプローブ作製用ベクター、例えばpBluescript IISK-(Stratagene社製)等に挿入し、T3プロモーターあるいはT7プロモーター等を利用して本発明の遺伝子に相補的なRNAを合成する。この際、合成されるRNAにジゴキシゲニン（ペーリンガーマンハイム社製）やアイソトープ等の適当な標識を付けておく。このようなRNAプローブを用いて、ラットの正常脳、及び虚血を誘発した脳における本遺伝子のmRNAの分布をin situハイブリダイゼーション法[遠山正彌監修、1994年、神経化学研究の先端技術プロトコル、厚生社より発刊、第23～83頁]により調べ、虚血を誘発した脳で特異的に発現誘導が観察されれば、脳虚血に関連する遺伝子であることが検証される。

【0019】本発明の遺伝子がコードする脳虚血関連ポリペプチド、すなわち、配列番号3又は6で示されるア

ミノ酸配列を有するポリペプチドは、例えば、前記のようにして取得した本発明の遺伝子を用い、遺伝子組換え技術により生産することができる。あるいは、ペプチド合成により生産することもできる。あるいはまた、生体もしくは培養細胞から精製単離し、実質的に純粋な形で取得することができる。実質的に純粋な形であるポリペプチドとは、90%以上の純度（きょう雑するポリペプチドの含量が10%未満）のものを意味する。

【0020】遺伝子組換え技術を用いる場合は、脳虚血関連ポリペプチドをコードするDNA、及びポリペプチドを生産するための発現系（宿主-ベクター系）を用いて公知の方法により実施できる。発現系（宿主-ベクター系）としては、例えば、細菌、酵母、昆虫細胞および哺乳動物細胞の発現系等が挙げられる。このうち、機能タンパクを得るためには、昆虫細胞および哺乳動物細胞を用いることが好ましい。

【0021】脳虚血関連ポリペプチドをコードするDNAとしては、例えば、前記のようにして取得できる脳虚血関連遺伝子のcDNA（例えば、配列番号1、配列番号2、配列番号4及び配列番号5に示されるcDNAの塩基配列）、あるいはその一部を用いることができる。また、アミノ酸に対応するコドンは公知であるので、前記のcDNA配列に限定されることなく、アミノ酸配列に対応するDNAを設計し、ポリペプチドをコードするDNAとして用いることができる。この場合、ひとつのアミノ酸をコードするコドンは各々1～6種類（例えば、Metは1種類、Leuは6種類）知られており用いるコドンの選択は任意でよいが、例えば発現に利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して、より発現効率の高い配列を設計することができる[Grantham, R. et al., Nucleic Acids Research, 第9巻、r43～r74頁(1981年)]。設計した塩基配列を持つDNAは、DNAの化学合成、前記cDNAの断片化と結合、塩基配列の一部改変等によって取得できる。人為的な塩基配列の一部改変、変異導入は、所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドからなるプライマーを利用して部位特異的変異導入法(site specific mutagenesis)[Mark, D. F. et al., Proceedings of National Academy of Sciences, 第81巻、第5662～5666頁(1984年)]等によって実施できる。

【0022】遺伝子組換え技術を用いてポリペプチドを哺乳動物細胞で発現させる場合には、例えば本発明のポリペプチドをコードするDNAを適当なベクター（例えば、SV40系ベクター、レトロウイルス系ベクター、パピローマウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター等）中の適当なプロモーター（例えば、SV40プロモーター、LTRプロモーター、エロンゲーション1 α プロモーター等）の下流に挿入して発現ベクターを構築する。次に、得られた発現ベクターで適当な哺乳動物細胞（例えば、サルCOS-7細胞、チャイニーズハム

スターCHO細胞、中枢又は末梢神経系の初代培養細胞等)を形質転換し、形質転換体を適当な培地で培養することによって、その細胞中もしくは培地中に目的とするポリペプチドが生産される。

【0023】また、大腸菌で発現させる場合には、本発明のポリペプチドをコードするDNAを、適当なプロモーター(例えば、trpプロモーター、lacプロモーター、λpLプロモーター、T7プロモーター等)の下流に接続し、大腸菌内で機能するベクター(例えば、pBR322、pUC18、pUC19等)に挿入して発現プラスミドを構築する。次に、この発現プラスミドで形質転換した大腸菌(例えば、E.coli DH5、E.coli JM109、E.coli HB101株等)を適当な培地で培養して、その菌体より目的とするポリペプチドを得ることができる。また、バクテリアのシグナルペプチド(例えば、pelBのシグナルペプチド)を利用すれば、ペリプラズム中に目的とするポリペプチドを分泌させることもできる。更に、他のポリペプチドとの融合蛋白(fusion protein)を生産することもできる。

【0024】以上のようにして得られたポリペプチドは、アミノ酸配列から推定される分子量などを指標にし、一般的な生化学的方法によって単離精製することができる。すなわち、目的タンパク質を発現している細胞の培養上清あるいは可溶化剤(例えば、SDSやTriton-Xなど)で可溶化した細胞を陰イオンあるいは陽イオン交換体などを充填したHPLCあるいはFPLCカラムなどにアプライし適当な溶出条件で溶出して目的タンパク質を回収することができる。

【0025】本発明の遺伝子もしくはDNAとしては、cDNA、染色体DNA(イントロン及びエキソンを含む)、イントロンを除きエキソンを連結した染色体DNA、人為的に合成したDNA等が含まれる。また、本発明の遺伝子もしくはDNAとしては、それらのフラグメント(断片)やホモログも含まれる。このようなホモログとしては、塩基配列において一又は複数個の塩基の欠損、付加(挿入)、置換等が認められる変異型遺伝子もしくはDNA等が挙げられ、例えば、自然界で発見される変異型遺伝子、人為的に改変した変異型遺伝子、異種生物由来の相同遺伝子等が含まれる。DNAのフラグメントとは、少なくとも10塩基、好ましくは少なくとも15塩基、より好ましくは少なくとも30塩基の連続する部分を意味する。

【0026】本発明のポリペプチドとしては、その断片もしくはそれらのホモログも含まれる。このような断片もしくはホモログは、本ポリペプチドと同様(実質的に同種・同効)の生物活性を有するものであるか、或いは、本ポリペプチドに対する抗体と交差反応を生じるというように本ポリペプチドと免疫学的同等性を有するものであればよい。このような断片もしくはホモログとしては、例えば、アミノ酸配列においてその一部が欠

損したもの(例えば、生物活性の発現に必要な部分だけから成るポリペプチド)、その一部が他のアミノ酸と置換したもの(例えば、物性の類似したアミノ酸に置換したもの)、およびその一部に他のアミノ酸が付加または挿入されたもの等が挙げられ、自然界で発見される変異型ポリペプチドのほか、人為的に改変した変異ポリペプチド、異種生物由来で同様の生物活性を有する相同ポリペプチド等が含まれる。ポリペプチドのホモログとは、一般に少なくとも20個、好ましくは少なくとも30個の連続したアミノ酸領域で、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%または90%、より好ましくは95%以上、アミノ酸配列上の同一性を有するものである。さらに、ポリペプチド(またはそれらのホモログ)のフラグメントとは、ポリペプチド(またはそれらのホモログ)の少なくとも10アミノ酸、好ましくは少なくとも15アミノ酸、例えば20、25、30、40、50または60アミノ酸の連続した部分を意味する。

【0027】本発明には、本発明の遺伝子(その翻訳領域もしくはプロモーター領域などを含む)と選択的にハイブリダイズし得る核酸(DNAもしくはRNA)、例えばアンチセンスDNA、アンチセンスRNAもしくはリボザイム等が含まれる。このようなDNA、RNAもしくはリボザイムは例えば化学合成等により取得できる。また、アンチセンスRNAは、遺伝子(cDNA等)を前記のような発現ベクターに、逆向きで(アンチセンス方向に)挿入することにより取得できる。これらアンチセンスDNA、アンチセンスRNAもしくはリボザイムは、細胞中の本発明の遺伝子及びポリペプチドの発現レベルを制御することに用いることができる。選択的にハイブリダイズし得る核酸とは、一般に、少なくとも20個、好ましくは少なくとも30個の連続した塩基配列領域で、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは90%以上、塩基配列上の同一性を有する核酸を意味する。

【0028】また、本発明には、本発明の遺伝子(もしくはDNA)を含むベクター、及びこれらで形質転換された宿主細胞も含まれる。このようなベクターとしては、複製起点(ori領域)を含む複製ベクター、プロモーター領域、プロモーターの制御因子、RNAのスプライス部位、ポリアデニル化部位又は転写終結配列等を含む発現ベクターが使用できる。またこれらベクターは、ひとつまたは二以上の選択的マーカー遺伝子、例えばアンピシリン耐性遺伝子等を含んでいるのが好ましい。このようなベクターの具体例としては、pBR322、pUC18、pUC19、pRS、pMAMneo、pCDM8、pEF-BOS、pYES2pMC1neo等のプラスミドベクター、pBacPAK8、pBacPAK9、pAcUW31、バキュロウイルス(AcNPV等)等のウイルスベクター、もしくはλg

t10、λgt11、λZAP等のファージベクターが挙げられる。本発明のDNAを含むベクターは、例えばDNAに相当するRNAを調製するために、または宿主細胞を形質転換するために用いられる。宿主細胞としては、例えば細菌、酵母、昆虫細胞、哺乳動物細胞が挙げられ、用いるベクターに合わせて適当な宿主細胞を選択するか、もしくは用いる宿主細胞に合わせて適当なベクターを選択すればよい。

【0029】また、本発明のポリペプチドを用いて、そのモノクローナルまたはポリクローナル抗体を取得することができる。モノクローナル抗体は、本発明のポリペプチド、その断片、またはその部分配列を有する合成ペプチド等を抗原として用い、通常ハイブリドーマ法などの技術により製造できる。また、モノクローナル抗体の遺伝子を改変してヒト化モノクローナル抗体等を作成できる。ポリクローナル抗体は、宿主動物（例えば、ウサギやマウス等）に本発明のポリペプチド、その断片、またはその部分配列を有する合成ペプチド等を接種し、免疫血清を回収する、通常の方法により製造することができる。このようにして得られるモノクローナル抗体、またはポリクローナル抗体を利用することにより、生体または培養細胞から、本発明のポリペプチドもしくは類似の構造、免疫原性を有するポリペプチドを検出し、精製分離することができる。また生体における該ポリペプチドの定量ができ、該ポリペプチドと脳虚血の病態との関係の研究あるいは疾患の診断などにも利用することができる。

【0030】以下、実施例をもって本発明をさらに詳しく説明するが、これらの実施例は本発明を制限するものではない。

【0031】なお、下記実施例において、各操作は特に明示がない限り、「Molecular Cloning」[Sambrook, J., Fritsch, E.F.及びManiatis, T. 著、Cold Spring Harbor Laboratory Pressより1989年に発刊]に記載の方法により行うか、または、市販の試薬やキットを用いる場合には市販品の指示書に従って使用した。

【0032】

【実施例】

実施例1 ラット脳虚血関連遺伝子のクローニング

1) アストロサイトの培養とこれを用いたin vitro 脳虚血-再灌流モデル

生直後のSD系ラットから大脳半球を摘出し、Dispase II (商品名、ペーリンガーマンハイム社製) で処理して細胞を単離する。得られた細胞を10%牛胎児血清含有のミニマム・エッセンシャル・メディウム (MEM) 中で10日間培養した後、線維芽細胞の増殖を抑えるために10 μ g/mlのシトシンアラビノフラノシド (cytosine arabinofuranoside) を添加した10%牛胎児血清含有MEM中で48時間培養し、さらにマ

イクログリアやオリゴデンドログリア細胞からアストロサイトを分離するために振とう培養する。培養皿に附着した細胞についてその形態を顕微鏡にて観察するとともに、アストロサイトのマーカーであるglial fibrillary acidic protein (GFAP) に対するモノクローナル抗体 (ISANBIO BV社製) を用いて免疫染色することによって、アストロサイトであることを確認する。これら細胞を5 \times 10⁴ cells/cm²の細胞密度で10%牛胎児血清含有MEM中に接種し、これを培養する。

【0033】in vitro 脳虚血-再灌流モデルは、上記のように培養した細胞を低酸素処理後再酸素化することにより作成する。細胞の低酸素処理は、コンフルエント (約2 \times 10⁵ cells/cm²) に達した細胞を、O₂濃度が1%以下 (95% N₂、5% CO₂) の低酸素培養機 (Coy Laboratory Products社製のHypoxia chamber) [Ogawara, Journal of Clinical Investigation, 第85巻、第1090~1098頁、1990年] 内で24時間培養することにより実施する。低酸素処理後の再酸素化は、前記のようにして低酸素処理した細胞を、低酸素培養機内から大気中に移し1ないし24時間放置することにより実施する。

【0034】2) 低酸素処理-再酸素化において発現誘導される遺伝子のクローニング

前記1) に従って低酸素処理後再酸素化したアストロサイト (再酸素化した後1時間放置した細胞) (約4 \times 10⁷ cells) から、アシッドグアニジン-フェノールクロロホルム法 (AGPC法) [豊島久真男、山本雅 監修、1993年、細胞工学実験プロトコル、秀潤社より発刊、第42~47頁] により、トータルRNAを抽出する。また、対照細胞として、低酸素処理のみ行ったアストロサイトを用い、同様にトータルRNAを抽出する。得られたトータルRNAをDNase I処理した後、これを用いて、ディファレンシャル・ディスプレイ法 [Liangら、Science、第257巻、第967~971頁 (1992年)] により、以下のように候補クローンの選択を行う。

【0035】MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus) の逆転写酵素 (300単位) 及び2.5 μ M オリゴ (dT) プライマーを用いて、DNase I処理済トータルRNA (約3 μ g) から一本鎖cDNAを合成する。得られた一本鎖cDNAを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR; polymerase chain reaction) を、1 μ Mのランダムプライマー [任意の配列からなる約10~12merのプライマー] 及び100 μ MのdNTP mixtureの存在下で行う。PCRは、95 $^{\circ}$ Cで1分間、40 $^{\circ}$ Cで1分間、72 $^{\circ}$ Cで30秒間の条件で40サイクル、及び最終サイクルとして72 $^{\circ}$ Cで5分間の条件で1サイクルを行って反応を終了し、このようなPCRを約100種類のプライマーについて行う。

【0036】これらPCR産物を、5%ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動した後、エチジウムブロマイドで染色する。ゲル上に展開されたバンドを観察し、低酸素処理後再酸素化した細胞由来のサンプルでは認められるが、対照細胞（低酸素処理のみ行なった細胞）由来のサンプルでは観察されないバンドを、候補クローンとして選択する。候補クローンのバンドに対応するゲル部分から、cDNA断片を溶出して回収し、前記と同様の条件でPCRを行って（前記PCRと同じプライマーを使用）DNAを増幅させた後、これを用いてベクタープラスミドpGEM-T（Promega社製）に候補クローンのcDNA断片をサブクローニングする。

【0037】3）低酸素処理-再酸素化アストロサイトにおける遺伝子発現のノーザンブロッティングによる解析

候補クローン由来のcDNA断片を、Random Primer DNALabeling Kit Ver. 2（商品名、宝酒造社製）を用いて α - 32 P-dCTPでラベルする。これをプローブとして用い、前記1)2)記載の方法で得られる低酸素処理後再酸素化アストロサイト及び対照細胞の各々より抽出した全RNAに対してノーザンブロッティングを行う。ノーザンブロッティングの結果、低酸素処理のみ行なった細胞では発現が認められないが、低酸素処理後再酸素化した細胞で特異的に発現していることを確認することにより、候補クローンが脳虚血関連遺伝子であることを確認できる。

【0038】4）全長cDNAのクローニングと塩基配列決定

前記3)で得られる候補クローンのcDNA断片を、Random Primer DNA Labeling Kit Ver. 2（商品名、宝酒造社製）を用いて α - 32 P-dCTPでラベルし、これをプローブとして、成熟ラット脳cDNAライブラリー（Stratagene社製）をスクリーニングし、得られる陽性クローンのうち挿入断片が長いクローンを選択する。これらクローン由来のプラスミド（ベクター部分はStratagene社製pBluescript SK-）について、常法により制限酵素切断地図を作製する。また、Kilo-Sequence用Deletion Kit（商品名、宝酒造社製）を用いて種々の欠失プラスミドを作成し、これを用いてダイデオキシ法により挿入cDNAの塩基配列を決定し、塩基配列を決定したcDNA部分を適宜つなぎ合わせて本発明の脳虚血関連遺伝子の全長cDNA断片を取得する。また、cDNAの塩基配列を解析して、オープンリーディングフレームを同定し、さらにコーディング領域の配列をアミノ酸配列に翻訳して、本発明の脳虚血関連遺伝子がコードするポリペプチドのアミノ配列を得る。

【0039】実施例2 脳虚血関連遺伝子のヒトホモログのクローニング

実施例1の4)項で得られるラット脳虚血関連遺伝子cDNAの翻訳領域を含む断片を、実施例1の3)項記載の方法と同様にして、 α - 32 P-dCTPでラベルし、これをプローブとして、ヒト脳cDNAライブラリー（Stratagene社製）を、前記実施例1の4)項記載の方法に準じてスクリーニングする。得られる陽性クローンのうち、挿入断片の長いクローンを選択し、これらクローン由来のプラスミド（ベクター部分はStratagene社製pBluescript SK-）について、前記実施例1の4)項記載の方法に準じて、挿入断片cDNAの塩基配列を決定する。かくして得られるヒト由来の脳虚血関連遺伝子cDNAの塩基配列について、ラット遺伝子とのホモロジーを含めて解析し、コーディング領域を同定する。さらにコーディング領域の配列をアミノ酸配列に翻訳して、ヒト由来の脳虚血関連遺伝子がコードするポリペプチドのアミノ配列を得る。

【0040】実験例1 低酸素処理-再酸素化アストロサイトにおける脳虚血関連遺伝子YT521の発現（ノーザンブロッティングによる解析）

ラットYT521遺伝子由来のcDNA断片（配列番号1の1246番目から3224番目の塩基に相当する断片）をプローブとし、実施例1の3)記載の方法に準じて、低酸素処理後再酸素化したラットアストロサイト、及び対照細胞の各全RNAに対してノーザンブロッティングを行った。ノーザンブロッティングの結果を図1に示した。図1から明らかなように、YT521 mRNAは、通常の培養方法により培養した細胞（レーン1）及び低酸素処理のみ行なった細胞（レーン2）では、発現が認められないが、低酸素処理後再酸素化した細胞（レーン3~7）で特異的に発現していることがわかった。このことから、YT521遺伝子は、アストロサイトに低酸素条件に曝された後再酸素化された際に特異的に発現する脳虚血関連遺伝子であると考えられた。

【0041】

【発明の効果】本発明の遺伝子およびそれがコードするポリペプチドは、アストロサイトを用いたin vitro脳虚血-再灌流モデルにおいて特異的に発現するものであり、脳虚血に関与することが明らかである。従って、本発明の新規遺伝子およびそれがコードするポリペプチドは、脳虚血の機構解明に有用である。また、脳虚血に伴う病変のモデル動物作成や予防もしくは治療薬などの開発のために用いることができる。また、該ポリペプチドに対する抗体は虚血による病変の程度を測定することに役立つ。

【0042】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：3224

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

生物名：ラット

配列：

GTTTCGGCA GGAAGCAGGC TCCATTTAG CGCGCCCGC CGTCGCCATC TGTTCCTCTC 60
 TCCTCCCCCT TGTCTCTGGT GTGGCCGAAT CCCCAACAGA AAGATTGAAG CCCCGCTGT 120
 COGAGTCAG GCGGGAAGAG AACCAAGGGA CGGGAGGAG GGTGCTCGTA GGAGCTGAGT 180
 GGAGCAGTTC AGGTCGAAGC GCGCGGCCG CGGACGGAC TGACGGACGG ACTCGTGCC 240
 CTGCGGCCG GGTGCGGGG CGCGCGGGA CTCGCTTCCC GCGCGGGTG GCGCGGGGG 300
 AAGCGGAGG GCAGCCATGG CGGCGACAG CGGGAGGAG AAAGATGGGG AACTTAATGT 360
 TTTAGATGAT ATTTGACTG AAGTACCAGA ACAGGATGAT GAACTGTATA ATCCAGAGAG 420
 TGAACAAGAT AAAAATGAGA AAAAAGGATC AAAAAGAAAA AGTAAAGAA TGAATCTAT 480
 TGACACCAAG CGACAGAAGC CTTCTATCCA TTCAAGACAA CTGATTTCTA AGCCACTAAG 540
 CTCATCTGTT AGCAATAATA AAAGAATAGT TAGTACAAAA GGAAAGTCGG TTACAGAATA 600
 TAAAAATGAG GAATATCAAA GATCTGAAAG GAACAAGCGT CTAGATGCTG ATCGAAAAAT 660
 TCGTCTGTCA AGCAGTTCTT CTAGAGAACC TTACAAGAGT CAACCAGAAA AACCTTGTCT 720
 ACGAAAAGG GATTCTGAAA GAAGGGCCAA GTCTCCTACA CCAGATGTTT CTGAGAGAAT 780
 TGGGCTTGAA GTTGATAGAC GTGCAAGCAG ATCCAGCCAG TCTTCAAAGG AAGAGGGGAA 840
 CTCTGAGGAG TATGGCTCTG ACCACGACAG AGGAAGCAGT GCTTCTTCTG AACAGGGCAA 900
 CAACACTGAG AATGAGGAGG AAGGAGGGGA AGAAGATGTA GAGGAAGATG AAGAGGTAGA 960
 TGAAGATGGA GATGATGATG AGGAAGTGA TGAAGATGCG GAGGAGGAGG AGGACGAGGA 1020
 AGAAGATGAG GAGGAGGAGG ATGAGGAAGA AGAAGAGGAA GAGGAAGAAG AATATGAACA 1080
 GGATGAGAGA GATCAGAAGG AAGAAGGGAA TGATTATGAC ACCCGTAGTG AGGCCAGTGA 1140
 TTCTGGTTCT GAGTCTGTTT CCTTACAGA TGGATCTGTC AGGTCTGGTT CAGGAACAGA 1200
 TGGATCAGAT GAGAAAAAGA AGGAAAGGAA GAGAGCTCGA GGCATATCAC CCATTGTCTT 1260
 TGATAGAAGT GGCAGTTCTG CATCAGAGTC ATATGCAGAT CAAACCAGTA AACTCAAATA 1320
 TGTCTTCAG GATGCAAGAT TTTTCTCAT AAAGAGTAAC AACCATGAGA ATGTGTCTCT 1380
 TGCCAAAGCA AAGGGTGTAT GGTCCACATT ACCTGTAAT GAGAAGAAAT TAAATCTTGC 1440
 GTTTAGATCT GCAAGGAGTG TTATATTAAT ATTTCTGTC AGGGAAAGTG GAAAGTTCA 1500
 AGGTTTGCC AGATTGTCAT CAGAATCGCA TCATGGTGGC TCTCTATAC ATTGGGTGCT 1560
 TCCAGCAGGA ATGAGTGCTA AAATGCTTGG AGGTGTTTTT AAAATTGACT GGATTTGCAG 1620
 GCGTGAATTA CCTTTACTA AGTCAGCTCA TCTACCAAT CCTGGAATG AACATAAGCC 1680
 AGTAAAGATT GGACGTGATG GACAGGAAAT TGAACCTGAA TGTGGAACCC AGCTTTGTCT 1740
 TCTGTTTCCC CCTGATGAAA GTATTGACTT GTATCAGCTC ATTCATAAAA TGCGTCACAA 1800
 GAGAAGAATG CATTCTCAGC CTGATCAAG AGGACGTCCA TCCCGTCGAG AACCAAGTCCG 1860
 GGATGTGGGA AGGCGTCGAC CAGAAGATTA TGATATTCAT AACAGCAGAA AGAAACCAAG 1920
 GATTGACTAT CCCCTGAGT TTACCAGAG ACCAGGGAT TTAAGGATC CCCGATACCA 1980
 GGAAGTTGAC AGACGATTTT CAGGAGTTCG CCGAGATGTG TTTTAAATG GGTCTACAA 2040
 TGATTATGTG AGGGAATTTT ATAACATGGG ACCACCGCCT CCTTGGCAAG GAATGCCTCC 2100
 TTACCCGGGA ATAGAACAGC CTCCACACCA TCCCTACTAC CAGCACCATG CCCCGCTCC 2160
 TCAAGCCAC CCCCTTACT CAGGACACCA TCCGGTACCA CATGAAGCAA GATACAGAGA 2220
 TAAAAGAGTA CATGACTATG ATATGAGGGT TGATGATTTT CTTCGCCGA CACAAGCCGT 2280
 TGTCAGTGGT CGGAGAAGTA GACCCCGAGA AAGAGATCGG GAGCGAGAGC GAGACCGCCC 2340
 TAGAGATAAC AGAAGAGATA GAGAGCGAGA CAGAGGTCGT GATCGAGAAA GAGAGAGAGA 2400
 AAGAATATGT GATCGGACA GAGACCGAGG GGAAAGAGGT CGTTATCGAA GATAATGTGC 2460
 TTTTGGAAAG CACTGACTGA AGATAAAAA TATTGTATTT TTTTGTGTG TGTTACAAG 2520
 TAGTAAATTT ATTTTCTGCT GTCTACTTAA AGCTCATGTG GTAGAAGGAT TTATTATCTT 2580
 CTTTGTCCA AGCATGCAGT AGAATAAGAA CTGGAAAACT CAGATCCGCC AAAAATGCA 2640
 CAGTTGACAG TTGAGTTGAC ACTTTTATTG GGCAGAAATG GAACAGTCCA AGAATGTAGA 2700
 TATTGATTCA TTCTCCATAA ATGTTCTTTT TACAGTGTAT TCATCCTAGA GTATTTTGT 2760

```

TTGTTTGTTC TCCTTCTTT GGACCTGGT CAATACTGCC ATAGTATTTT GCTTTGTGTT 2820
TCTATAGGTA GCTGCACAAG GTTCAGTAAA AATAATGCTG CTATCAAGTA TGCAGATATT 2880
GAGTATGATG GTTTGACTAT ATGGCAGTGT TGTAGCAGCC TCTCGGTTC TCCTCTTCCC 2940
TCCTTTTTTT TAAACCTATA AATCCACTTT TTTTTTAAGT CTTCAATGAT GAGAGCAATA 3000
TTAAGAAGAC ATTGCTATCT AATTTTTAAT CTTTTTAAAT AAAACGTTC TATGTTGAGT 3060
AGCATGGTCG ATGCTATTGT TTAGCCTTCC TTCCAACTG TACATTGGCT TGGAAATGTC 3120
AGTTTTGCGT GTGTGGCAGC AGAAGATAAC CCCACATTCT ACATTGCTAC TGTTTTGTAT 3180
GAAATAAATT GGTAAAGATT GACACTAAAA AAAAAAAAAA AAAA 3224

```

【0043】配列番号：2

配列の長さ：2139

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

生物名：ラット

配列：

```

ATGGCGGCCG ACAGCCGCGA GGAGAAAGAT GGGGAACTTA ATGTTTAGA TGATATTTG 60
ACTGAAGTAC CAGAACAGGA TGATGAACCTG TATAATCCAG AGAGTGAACA AGATAAAAAAT 120
GAGAAAAAAG GATCAAAAAG AAAAAGTGAA AGAATGGAAT CTATTGACAC CAAGCGACAG 180
AAGCCTTCTA TCCATTCAAG ACAACTGATT TCTAAGCCAC TAAGCTCATC TGTTAGCAAT 240
AATAAAAGAA TAGTTAGTAC AAAAGGAAAG TCGGTTACAG AATATAAAAA TGAGGAATAT 300
CAAAGATCTG AAAGGAACAA GCGTCTAGAT GCTGATCGAA AAATTCGTCT GTCGAAGCAGT 360
TCCTCTAGAG AACCTTACAA GAGTCAACCA GAAAAACCTT GTCTACGGAA AAGGGATTCT 420
GAAAGAAGGG CCAAGTCTCC TACACCAGAT GGTCTGAGA GAATGGGCT TGAAGTTGAT 480
AGACGTGCAA GCAGATCCAG CCAGTCTTCA AAGGAAGAGG GGAACCTGTA GGAGTATGGC 540
TCTGACCACG AGACAGGAAG CAGTGTCTCT TCTGAACAGG GCAACAACAC TGAGAATGAG 600
GAGGAAGGAG GGGAAGAAGA TGTAGAGGAA GATGAAGAGG TAGATGAAGA TGGAGATGAT 660
GATGAGGAAG TGGATGAAGA TCGGAGGAG GAGGAGGAGC AGGAAGAAGA TGAGGAGGAG 720
GAGGATGAGG AAGAAGAAGA GGAAGAGGAA GAAGAATATG AACAGGATGA GAGAGATCAG 780
AAGGAAGAAG GGAATGATTA TGACACCGT AGTGAGGCCA GTGATTCGTT TCTGAGTCT 840
GTTTCTTCA CAGATGGATC TGTACGGTCT GGTTCAGGA ACAGATGGATC AGATGAGAAA 900
AAGAAGGAAA GGAAGAGAGC TCGAGGCATA TCACCCATTG TCTTTGATAG AAGTGGCAGT 960
TCTGCATCAG AGTCATATGC AGATCAAACC AGTAAACTCA AATATGTCTT TCAGGATGCA 1020
AGATTTTCC TCATAAAGAG TAACAACCAT GAGAATGTGT CTCTTGCCAA AGCAAAGGGT 1080
GTATGGTCCA CATACCTGT AAATGAGAAG AAATTAATC TTGCGTTTAG ATCTGCAAGG 1140
AGTGTATAT TAATATTTT TGTCAGGGAA AGTGGAAGT TTCAAGGTTT TGCCAGATTG 1200
TCATCAGAAT CGCATCATGG TGGCTCTCCT ATACATTGGG TGCTTCCAGC AGGAATGAGT 1260
GCTAAAATGC TTGGAGGTGT TTTTAAATTT GACTGGATTT GCAGGCGTGA ATTACCCTTT 1320
ACTAAGTCAG CTCATCTCAC CAATCCCTGG AATGAACATA AGCCAGTAAA GATGGACGT 1380
GATGGACAGG AAATGAACT TGAATGTGGA ACCCAGCTTT GTCTTCTGTT TCCCCTGAT 1440
GAAAGTATG ACTTGATCA GCTCATTCT AAAATGCGTC ACAAGAGAAG AATGCATTCT 1500
CAGCCTCGAT CAAGAGGAGC TCCATCCGTT CGAGAACCAG TCCGGGATGT GGGAAGGCGT 1560
CGACCAGAAG ATTATGATAT TCATAACAGC AGAAAGAAAC CAAGGATGTA CTATCCCCT 1620
GAGTTTACC AGAGACCAGG GTATTTAAAG GATCCCAGT ACCAGGAAGT TGACAGACGA 1680
TTTTCAGGAG TTCGCGGAGA TGTGTTTTTA AATGGTCCT ACAATGATTA TGTGAGGGAA 1740
TTTCATAACA TGGACCACC GCCTCCTGG CAAGGAATGC CTCCTACCC GGGAAAGAA 1800
CAGCCTCCAC ACCATCCCTA CTACCAGCAC CATGCCCGC CTCCTCAAGC CCACCCCT 1860
TACTCAGGAC ACCATCCGTT ACCACATGAA GCAAGATACA GAGATAAAGC AGTACATGAC 1920
TATGATATGA GGGTTGATGA TTTCTTCGC CGCACACAAG CCGTTGTGAG TGGTCGGAGA 1980
AGTAGACCCC GAGAAAGAGA TCGGAGGAGA GAGCGAGACC GCCCTAGAGA TAACAGAAGA 2040
GATAGAGAGC GAGACAGAGG TCGTATCGA GAAAGAGAGA GAGAAAGAAAT ATGTGATCGG 2100
GACAGAGACC GAGGGGAAAG AGGTCGTTAT CGAAGATAA 2139

```

【0044】配列番号：3

配列の長さ：712

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源

生物名：ラット

配列：

Met	Ala	Ala	Asp	Ser	Arg	Glu	Glu	Lys	Asp	Gly	Glu	Leu	Asn	Val	1	5	10	15
Leu	Asp	Asp	Ile	Leu	Thr	Glu	Val	Pro	Glu	Gln	Asp	Asp	Glu	Leu	20	25	30	35
Tyr	Asn	Pro	Glu	Ser	Glu	Gln	Asp	Lys	Asn	Glu	Lys	Lys	Gly	Ser	35	40	45	50
Lys	Arg	Lys	Ser	Glu	Arg	Met	Glu	Ser	Ile	Asp	Thr	Lys	Arg	Gln	50	55	60	65
Lys	Pro	Ser	Ile	His	Ser	Arg	Gln	Leu	Ile	Ser	Lys	Pro	Leu	Ser	65	70	75	80
Ser	Ser	Val	Ser	Asn	Asn	Lys	Arg	Ile	Val	Ser	Thr	Lys	Gly	Lys	80	85	90	95
Ser	Val	Thr	Glu	Tyr	Lys	Asn	Glu	Glu	Tyr	Gln	Arg	Ser	Glu	Arg	95	100	105	110
Asn	Lys	Arg	Leu	Asp	Ala	Asp	Arg	Lys	Ile	Arg	Leu	Ser	Ser	Ser	110	115	120	125
Ser	Ser	Arg	Glu	Pro	Tyr	Lys	Ser	Gln	Pro	Glu	Lys	Pro	Cys	Leu	125	130	135	140
Arg	Lys	Arg	Asp	Ser	Glu	Arg	Arg	Ala	Lys	Ser	Pro	Thr	Pro	Asp	140	145	150	155
Gly	Ser	Glu	Arg	Ile	Gly	Leu	Glu	Val	Asp	Arg	Arg	Ala	Ser	Arg	155	160	165	170
Ser	Ser	Gln	Ser	Ser	Lys	Glu	Glu	Gly	Asn	Ser	Glu	Glu	Tyr	Gly	170	175	180	185
Ser	Asp	His	Glu	Thr	Gly	Ser	Ser	Ala	Ser	Ser	Glu	Gln	Gly	Asn	185	190	195	200
Asn	Thr	Glu	Asn	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Glu	Glu	Asp	Val	Glu	Glu	200	205	210	215
Asp	Glu	Glu	Val	Asp	Glu	Asp	Gly	Asp	Asp	Asp	Glu	Glu	Val	Asp	215	220	225	230
Glu	Asp	Ala	Glu	Glu	Glu	Glu	Asp	Glu	Glu	Glu	Asp	Glu	Glu	Glu	230	235	240	245
Glu	Asp	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Tyr	Glu	Gln	245	250	255	260
Asp	Glu	Arg	Asp	Gln	Lys	Glu	Glu	Gly	Asn	Asp	Tyr	Asp	Thr	Arg	260	265	270	275
Ser	Glu	Ala	Ser	Asp	Ser	Gly	Ser	Glu	Ser	Val	Ser	Phe	Thr	Asp	275	280	285	290
Gly	Ser	Val	Arg	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Gly	Ser	Asp	Glu	Lys	290	295	300	305
Lys	Lys	Glu	Arg	Lys	Arg	Ala	Arg	Gly	Ile	Ser	Pro	Ile	Val	Phe	305	310	315	320
Asp	Arg	Ser	Gly	Ser	Ser	Ala	Ser	Glu	Ser	Tyr	Ala	Asp	Gln	Thr	320	325	330	

Ser Lys Leu Lys Tyr Val Leu Gln Asp Ala Arg Phe Phe Leu Ile		
	335	340 345
Lys Ser Asn Asn His Glu Asn Val Ser Leu Ala Lys Ala Lys Gly		
	350	355 360
Val Trp Ser Thr Leu Pro Val Asn Glu Lys Lys Leu Asn Leu Ala		
	365	370 375
Phe Arg Ser Ala Arg Ser Val Ile Leu Ile Phe Ser Val Arg Glu		
	380	385 390
Ser Gly Lys Phe Gln Gly Phe Ala Arg Leu Ser Ser Glu Ser His		
	395	400 405
His Gly Gly Ser Pro Ile His Trp Val Leu Pro Ala Gly Met Ser		
	410	415 420
Ala Lys Met Leu Gly Gly Val Phe Lys Ile Asp Trp Ile Cys Arg		
	425	430 435
Arg Glu Leu Pro Phe Thr Lys Ser Ala His Leu Thr Asn Pro Trp		
	440	445 450
Asn Glu His Lys Pro Val Lys Ile Gly Arg Asp Gly Gln Glu Ile		
	455	460 465
Glu Leu Glu Cys Gly Thr Gln Leu Cys Leu Leu Phe Pro Pro Asp		
	470	475 480
Glu Ser Ile Asp Leu Tyr Gln Leu Ile His Lys Met Arg His Lys		
	485	490 495
Arg Arg Met His Ser Gln Pro Arg Ser Arg Gly Arg Pro Ser Arg		
	500	505 510
Arg Glu Pro Val Arg Asp Val Gly Arg Arg Arg Pro Glu Asp Tyr		
	515	520 525
Asp Ile His Asn Ser Arg Lys Lys Pro Arg Ile Asp Tyr Pro Pro		
	530	535 540
Glu Phe His Gln Arg Pro Gly Tyr Leu Lys Asp Pro Arg Tyr Gln		
	545	550 555
Glu Val Asp Arg Arg Phe Ser Gly Val Arg Arg Asp Val Phe Leu		
	560	565 570
Asn Gly Ser Tyr Asn Asp Tyr Val Arg Glu Phe His Asn Met Gly		
	575	580 585
Pro Pro Pro Pro Trp Gln Gly Met Pro Pro Tyr Pro Gly Ile Glu		
	590	595 600
Gln Pro Pro His His Pro Tyr Tyr Gln His His Ala Pro Pro Pro		
	605	610 615
Gln Ala His Pro Pro Tyr Ser Gly His His Pro Val Pro His Glu		
	620	625 630
Ala Arg Tyr Arg Asp Lys Arg Val His Asp Tyr Asp Met Arg Val		
	635	640 645
Asp Asp Phe Leu Arg Arg Thr Gln Ala Val Val Ser Gly Arg Arg		
	650	655 660
Ser Arg Pro Arg Glu Arg Asp Arg Glu Arg Glu Arg Asp Arg Pro		
	665	670 675
Arg Asp Asn Arg Arg Asp Arg Glu Arg Asp Arg Gly Arg Asp Arg		
	680	685 690
Glu Arg Glu Arg Glu Arg Ile Cys Asp Arg Asp Arg Asp Arg Gly		
	695	700 705

Glu Arg Gly Arg Tyr Arg Arg
710 712

【0045】配列番号：4
配列の長さ：1362
配列の型：核酸
鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状
配列の種類：cDNA to mRNA
起源
生物名：ヒト

配列：
CGCGTCGACC AGAAGATTAT GATATTCATA ACAGCAGAAA GAAACCAAGG ATTGACTATC 60
CCCCTGAGTT TCACCAGAGA CCAGGGTATT TAAAGGATCC ACGATACCAG GAAGTGGACA 120
GACGATTTTC AGGAGTTTCG CGAGATGTGT TTTTAAATGG GTCCTACAAT GATTATGTGA 180
GGGAATTTCA TAACATGGGA CCACCACCAC CTTGGCAAGG AATGCCCCCT TACCCAGGAA 240
TGGACAACCC TCCACCCAT CCTTACTATC AGCACCATGC TCCACCTCCT CAAGCTCATC 300
CCCCTTACTC AGGACATCAT CCAGTACCAC ATGAAGCAAG ATACAGAGAT AAACGAGTAC 360
ATGATTATGA TATGAGGGTG GATGATTTCC TTCGTCGCAC ACAAGCTGTT GTCAGTGGCC 420
GGAGAAGTAG ACCCCGTGAA AGAGACCGGG AACGAGAGCG AGACCGCCCT AGAGATAACA 480
GACGAGACAG AGAGCGAGAT AGAGGACGTG ATAGAGAAAG AGAAAGAGAG CGATTATGTG 540
ATCGAGACAG AGACCGAGGG GAGAGAGGTC GATATAGAAG ATAATGGGCT TTTGGAAGCA 600
CTGATTGTTT AAAGATACAA AAAATCTTGT ATTTTTTTTT TGTGTGTGTT TACAAGTAGT 660
AAATTTATTT TCAGCTGTCT GCCTATGAAG TTCATTGTGT AGAAGGATTT ATTATGACCC 720
CCTTTGTTC AAGCATGCAG TATCATAAGA ACTGGAAAAA CTCAAAATCC GCCAAAAATC 780
CACAGCTGAC AGTTGAATTG ACACTTTTAT TGGGGCAGAA TGGAAACAGTC CAAGAATGTA 840
GATACTGATT CTTCTCCAT AAATGTTCTT ATAGTGTGTT CATCTAGAG TTATTTTTTT 900
GTTTGTTTTT TTCCTTTTGT GATCTTGATT GATAACTGCC ATGATATTTT GCTTTGATGT 960
GTTTCTACAT GTAGTGCAC ACGGTTCAAT AAAAATAATG CTGCTATCGA GTATGCAAAT 1020
ATTGAAGTAT GATGGTTTGA CTGTATGGCA GTGTTGTAGC AGCCTCTGT TTTTTCCCC 1080
ATTGCCTCT TTTTTAAAA ACTTATAAAG TCACTTTTTA TTTTCTCA GTCTTCAATG 1140
ACGAGAGCAA TATTAAGAAG ACATTGCTAT CTAATTTTAA ATCTTTTAA ATGAAAAATT 1200
CCTATGTTCA GTAGCGTGGT TGATGCTATT GTTAGCCTT CCCCTCCAAA TTGATACAT 1260
TGGCTTGAA TGTTCAACAC TTGCGTGGT GGCAGCGAA GACGATCCC ATATTCTACA 1320
TTGCTACTGT TTTGTATAAA ATAAATTGGT AAAGATTAAG GG 1362

【0046】配列番号：5
配列の長さ：584
配列の型：核酸
鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状
配列の種類：cDNA to mRNA
起源
生物名：ヒト

配列：
CGCGTCGACC AGAAGATTAT GATATTCATA ACAGCAGAAA GAAACCAAGG ATTGACTATC 60
CCCCTGAGTT TCACCAGAGA CCAGGGTATT TAAAGGATCC ACGATACCAG GAAGTGGACA 120
GACGATTTTC AGGAGTTTCG CGAGATGTGT TTTTAAATGG GTCCTACAAT GATTATGTGA 180
GGGAATTTCA TAACATGGGA CCACCACCAC CTTGGCAAGG AATGCCCCCT TACCCAGGAA 240
TGGACAACCC TCCACCCAT CCTTACTATC AGCACCATGC TCCACCTCCT CAAGCTCATC 300
CCCCTTACTC AGGACATCAT CCAGTACCAC ATGAAGCAAG ATACAGAGAT AAACGAGTAC 360
ATGATTATGA TATGAGGGTG GATGATTTCC TTCGTCGCAC ACAAGCTGTT GTCAGTGGCC 420
GGAGAAGTAG ACCCCGTGAA AGAGACCGGG AACGAGAGCG AGACCGCCCT AGAGATAACA 480
GACGAGACAG AGAGCGAGAT AGAGGACGTG ATAGAGAAAG AGAAAGAGAG CGATTATGTG 540
ATCGAGACAG AGACCGAGGG GAGAGAGGTC GATATAGAAG ATAA 584

【0047】配列番号：6
配列の長さ：193

配列の型：アミノ酸
トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質
起源

生物名：ヒト

配列：

```

Arg Arg Pro Glu Asp Tyr Asp Ile His Asn Ser Arg Lys Lys Pro
 1           5           10           15
Arg Ile Asp Tyr Pro Pro Glu Phe His Gln Arg Pro Gly Tyr Leu
           20           25           30
Lys Asp Pro Arg Tyr Gln Glu Val Asp Arg Arg Phe Ser Gly Val
           35           40           45
Arg Arg Asp Val Phe Leu Asn Gly Ser Tyr Asn Asp Tyr Val Arg
           50           55           60
Glu Phe His Asn Met Gly Pro Pro Pro Pro Trp Gln Gly Met Pro
           65           70           75
Pro Tyr Pro Gly Met Glu Gln Pro Pro His His Pro Tyr Tyr Gln
           80           85           90
His His Ala Pro Pro Pro Gln Ala His Pro Pro Tyr Ser Gly His
           95           100          105
His Pro Val Pro His Glu Ala Arg Tyr Arg Asp Lys Arg Val His
           110          115          120
Asp Tyr Asp Met Arg Val Asp Asp Phe Leu Arg Arg Thr Gln Ala
           125          130          135
Val Val Ser Gly Arg Arg Ser Arg Pro Arg Glu Arg Asp Arg Glu
           140          145          150
Arg Glu Arg Asp Arg Pro Arg Asp Asn Arg Arg Asp Arg Glu Arg
           155          160          165
Asp Arg Gly Arg Asp Arg Glu Arg Glu Arg Glu Arg Leu Cys Asp
           170          175          180
Arg Asp Arg Asp Arg Gly Glu Arg Gly Arg Tyr Arg Arg
           185          190          193

```

【図面の簡単な説明】

【図1】 低酸素処理後再酸素化した初代培養ラットアストロサイト
ストロサイト (invitro 脳虚血-再灌流モデル) におけ

るYT521遺伝子の発現をノーザンブロッティングに
より解析した結果を示す写真。

【図1】

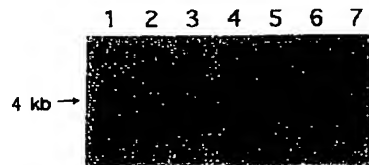


図1 低酸素処理後再酸素化した初代培養ラットアストロサイト
(in vitro 脳虚血-再灌流モデル) におけるYT521遺伝子の発現を
ノーザンブロッティングにより解析した結果を示す写真。

- 1 通常培養
- 2 低酸素化処理
- 3 再酸素化 0.5h後
- 4 • 1 h後
- 5 • 4 h後
- 6 • 12 h後
- 7 • 24 h後

Best Available Copy

フロントページの続き

(51)Int. Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/02			C 1 2 N 5/00	B
C 1 2 P 21/08		9282-4B	15/00	C

(72)発明者 今泉 和則
兵庫県三田市武庫が丘5丁目2 G-305